

Aplicación combinada de un polímero de quitosana y el inoculante Azofer-S, en la nodulación y el crecimiento *in vivo* de la soya (*Glycine max* L. Merrill).

Autores: Daimy Costales, Lisbel Travieso y Alejandro Falcón.

Introducción.

La soya [*Glycine max* (L.), Merrill], es la oleaginosa de mayor importancia a nivel mundial, tanto por los volúmenes comercializados de semillas como por los subproductos que se obtienen. Desde el punto de vista agrícola, la soya juega un papel muy importante no sólo como materia prima para la elaboración de alimentos balanceados, sino también, como cultivo de asociación y rotación con otros cultivos de interés económico para el hombre, esenciales en los sistemas productivos sostenibles (1). Además, ésta oleaginosa, se considera un cultivo mejorador del suelo, ya que garantiza la conservación de su potencial productivo por su capacidad de fijar el nitrógeno, en simbiosis con rizobios, y proporciona este elemento al desarrollo de otros cultivos (2). Como leguminosa, es capaz de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico y por lo tanto, depende de mucho menos fertilizantes nitrogenados minerales que la mayoría de los cultivos.

El Azofer-S, es un inoculante elaborado a base de rizobios del género *Bradyrhizobium* para la inoculación de semillas de soya, y tiene la particularidad, a diferencia de otros inoculantes de su tipo, que contiene altas concentraciones de factores de nodulación (oligómeros de lipoquitinas), determinantes en el éxito de esta simbiosis. Este producto es obtenido y comercializado por el INCA y está autorizado su uso en Cuba por encontrarse registrado desde el 2013.

Las quitosanas son un grupo de heteropolisacáridos que comprenden copolímeros formados por residuos de D-glucosamina y N-acetil glucosamina, unidos por enlaces β 1-4. Son el principal derivado del polímero natural conocido como quitina. La heterogeneidad de las quitosanas depende de sus características físico-químicas (3), siendo el grado de acetilación y la masa molar de la quitosana, las propiedades que más influyen en el comportamiento biológico de estos compuestos en la activación del crecimiento, la actividad antimicrobiana y la inducción de resistencia ante diversos patógenos (4, 5).

Trabajos previos demostraron que quitosanas de diferente masa molar, adicionadas al medio vegetal, benefician la nodulación y el crecimiento *in vitro* de plantas de soya (6), pero no se conoce si otras formas de aplicación de los quitosacáridos afectan la respuesta simbiótica de esta interacción y el crecimiento de las plantas en condiciones de experimentación *in vivo*. Por tanto, en este trabajo fue evaluado el efecto de un polímero de quitosana y el Azofer-S adicionados a la semilla, previo a la siembra, en la nodulación y el crecimiento de soya en dos momentos del crecimiento de las plantas, en cámara de crecimiento.

Materiales y Métodos.

A semillas de soya (80 semillas por tratamiento), se les adicionó 0.16 mL de una mezcla previamente elaborada con Azofer-S (4×10^{10} UFC.mL⁻¹) y una solución acidulada de un polímero de quitosana (MM= 100 kDa y GA= 13,7 %) antes de efectuar la siembra en potes (1kg) con suelo ferralítico rojo compactado eútrico (1.83% de materia orgánica, 6.83 Cmol.kg⁻¹ de calcio, 0.83 Cmol.kg⁻¹ % de magnesio, 76.3 ppm de fósforo y pH= 6.8). Las mezclas se conformaron con Azofer-S (3,3 mL) y las distintas concentraciones del polímero (0, 10, 50, 100, 500, 1000 y 2000 mg.L⁻¹), ajustadas con agua estéril a 10 mL de volumen final. Se emplearon 16 potes con 5 semillas para cada tratamiento hasta efectuarse el raleo a los 7 días de efectuada la siembra (dds), dejándose dos plantas por pote. Las plantas se cultivaron en cámara de crecimiento a temperatura de 25 °C, humedad relativa de 40% y 12/16 de luz/oscuridad. Se emplearon como controles, plantas no inoculadas (C1) y plantas inoculadas con el inoculante Azofer-S (C2) sin la aplicación del polímero.

Siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado a los 18 y 35 dds, se seleccionaron, por cada tratamiento, siete potes para la determinación de:

- Indicadores de nodulación (número y masa de nódulos totales, porcentaje de efectividad de los nódulos).
- indicadores de crecimiento (altura, número de hojas trifoliadas, longitud radical, masa seca aérea y radical).

- Indicadores fisiológicos en hojas con el uso de medidores portátiles. Área foliar (AM 300, UK), contenido de clorofilas (Konica Minolta SPAD- 502 Plus, Japón), color (Minolta Chroma CR- 400, Japón).
- Indicadores bioquímicos en hojas o nódulos, a partir de sus masas secas (75°C), a los 35 días de la siembra. Contenido de nitrógeno (método modificado de Kjeldah) y fósforo (método colorimétrico). Se estimó el porcentaje de proteínas, multiplicando el contenido de nitrógeno por 6.25.

Los datos obtenidos fueron sometidos después de la verificación de las premisas del ANOVA, a un análisis de varianza de Clasificación Simple. Las medias resultantes se compararon con la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD para $p \leq 0.05$ en el programa Statgraphics Plus, versión 5 (Statistical Graphics Corporation, 2001).

Resultados y Discusión.

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de un polímero de quitosana en la nodulación, el crecimiento, la fisiología y el metabolismo de plantas de soya inoculadas con Azofer-S, en condiciones de cámara de crecimiento. Tanto en la nodulación como en el crecimiento del cultivo, fue observado un efecto benéfico de la aplicación del polímero en combinación con el inoculante, en la mayoría de las variables analizadas, a los 18 y 35 días de efectuada la siembra.

Los resultados experimentales demuestran que la aplicación del polímero, en las distintas concentraciones ensayadas (de 0 a 2000 mg.L⁻¹), a semillas de soya con el Azofer-S, influyó en la simbiosis de la soya con su simbiote en dependencia de la concentración y del momento de evaluación de la soya (Tabla 1). Las plantas procedentes de semillas tratadas con el polímero tuvieron mayor respuesta en el número de los nódulos, el crecimiento, el área foliar y el contenido de clorofila, con valores superiores y diferentes de las semillas no tratadas con la quitosana (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto de la adición a semillas, del inoculante Azofer-S y el polímero de quitosana, en el número y la masa seca de los nódulos totales a los 18 y 35 días de sembrada la soya (dds), además del contenido de macronutrientes en nódulos a los 35 dds. Letras iguales no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD.

Tratamientos	18 días		35 días			
	No. nódulos	MS nód. (g)	No. nódulos	MS nód. (g)	Macronutrientes (%)	
					N	P
C1	0.50 d	0.001 b	2.79 b	0.011 c	5.33	0.42
C2	11.17 abc	0.010 a	27.21 a	0.086 a	5.3	0.36
10	10.83 abc	0.008 a	28.50 a	0.09 ab	5.31	0.36
50	7.25 c	0.008 a	21.14 a	0.081 bc	5.4	0.38
100	11.08 abc	0.008 a	21.36 a	0.098 ab	5.04	0.31
500	8.58 bc	0.009 a	22.21 a	0.097 ab	5.24	0.34
1000	14.08 a	0.010 a	23.64 a	0.094 ab	5.02	0.35
2000	12.33 ab	0.011 a	23.14 a	0.096 ab	5.19	0.32
ES (x)	0.97	0.001	1.77	0.004	0.09 (ns)	0.02 (ns)

Tabla 2. Efectos de concentraciones de un polímero de quitosana en el crecimiento de plantas de soya inoculada con Azofer-S, a los 35 días de efectuada la siembra en condiciones controladas.

Tratamientos	No. hojas	Altura (cm)	L. radical (cm)	MS área (g)	MS radical (g)	Á. foliar (cm ²)	Clorofilas (Spad)	N foliar (%)	Proteínas (%)
--------------	-----------	-------------	-----------------	-------------	----------------	------------------------------	-------------------	--------------	---------------

C1	3.3 b	29.2 c	32.5 b	0.76 b	0.3	97.3 d	19.3 c	2.09 b	13.09 b
C2	4.43 a	32.6 c	32.3 b	0.96 a	0.31	176.4 c	26.0 b	3.21 a	20.09 a
Q- 10	4.79 a	37.9 b	32.5 b	1.13 a	0.34	187.5 bc	26.4 ab	3.11 a	19.43 a
Q- 50	4.29 a	38.4 b	33.9 ab	1.03 a	0.35	170.9 c	27.8 ab	3.29 a	20.56 a
Q- 100	4.64 a	41.4 ab	35.4 ab	1.09 a	0.34	215.1 ab	27.8 ab	3.64 a	22.78 a
Q- 500	4.64 a	42.5 a	36.5 a	1.12 a	0.35	230.5 a	28.5 a	3.55 a	22.15 a
Q- 1000	4.57 a	38.5 b	35.4 ab	1.07 a	0.33	176.4 c	28.4 a	3.53 a	22.09 a
Q- 2000	4.43 a	41.4 ab	33.7 ab	1.06 a	0.37	184.2 bc	27.8 ab	3.68 a	23.00 a
ES X	0.13	0.9	0.91	0.04	n.s (0.03)	7.5	0.52	0.12	0.73

Las concentraciones del polímero que más se destacaron en el número de nódulos, fueron las más altas (1000 y 2000 mg.L⁻¹) a los 18 dds, sin embargo, en la masa seca de los mismos, la quitosana no tuvo efecto alguno al no modificar la respuesta encontrada con la adición del inoculante Azofer-S (Tabla 1). También, la aplicación del polímero además de inducir la fijación biológica del nitrógeno, evidenciada por el porcentaje de efectividad en los nódulos, también acumuló porcentajes medios y altos de nitrógeno en hojas y nódulos, respectivamente.

Es importante resaltar, que los nódulos se localizaron fundamentalmente, en la corona y en la raíz principal de la soya, en todos los tratamientos. Por otra parte, los nódulos encontrados en algunas plantas provenientes del control no inoculado con Azofer-S, fueron muy escasos, ya que se produjeron como resultado de la infección de su simbionte nativo en el suelo.

En el proceso de crecimiento, a los 35 dds, la concentración 500 mg.L⁻¹ del polímero, indujo los mayores valores de altura, longitud radical, contenido de clorofilas y superficie foliar en las plantas, respecto al control inoculado (C2), con incrementos de 23.3, 11.5, 8.8 y 23.5 %, respectivamente. A esta concentración, le precedió 100 mg.L⁻¹ del polímero en estas variables (Tabla 2). Similares resultados fueron reportados por Mondal *et al.*, 2011 (7), con la aspersion foliar de espinaca india de una quitosana polimérica al incrementar tanto los caracteres morfológicos, fisiológicos como el rendimiento de las plantas.

Otro aspecto a destacar es que el polímero de quitosana, aceleró la aparición y el número de flores de las plantas con las concentraciones de 500 y 1000 mg.L⁻¹ a los 35 dds de soya (datos no mostrados). Limpanavech *et al.*, 2003 (8), con la aplicación de un polímero de quitosana, indujo la floración temprana de orquídeas, lo que sugiere que este compuesto adelanta el crecimiento de las plantas en dependencia de la concentración.

Varios autores han demostrado que la quitosana promueve la germinación, el crecimiento de la parte aérea y radical de las plantas (9), adelanta el período de floración y fructificación (10), e incrementa el tamaño y el peso de los frutos, así como también el número de flores (4, 11). De acuerdo a los estudios realizados por algunos de estos autores, la respuesta en las diferentes variables depende de las concentraciones empleadas, entre otros factores (12).

En cuanto al contenido de macronutrientes en hojas, sólo se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno foliar, mostrando valores diferentes y superiores con los tratamientos inoculados con Azofer-S en relación al control absoluto, que muestra el valor menor, por lo que se evidencia un menor aporte de este nutriente a la planta.

Según el diagrama de cromaticidad CIELAB, predominó en las hojas de las plantas el color verde-amarillo a los 18 días, que se tornó rojizo a los 35 días. La concentración de 500 mg.L⁻¹ indujo mayor luminosidad (amarilla) y cromaticidad de color verde (a) y amarilla (b), con valores superiores y diferentes del control absoluto, a los 15 dds. Sin embargo, a los 35 días, todas las concentraciones del polímero manifestaron menor luminosidad, siendo de tonalidad rosada, mayor color rojizo (a) y color azul (b) que C1 (datos no mostrados).

Resultados informados en otras leguminosas, con el empleo de diferentes concentraciones de quitosana añadidas al suelo, favorecieron el crecimiento y los rendimientos de plantas de frijol, además de elevar los contenidos de clorofilas, mejorar el retoño, la longitud de la raíz, los pesos frescos y secos de retoños y raíces y el área de las hojas (13).

Tomando en cuenta lo que se dijo anteriormente, es posible incrementar la efectividad de la nodulación y el desarrollo de la soya mediante la aplicación de formas poliméricas de quitosana, asumiendo que son compuestos activos, con potencialidades biológicas, y que se obtienen a partir de desechos de la industria pesquera con un bajo costo. Utilizando concentraciones y dosis adecuadas de estos compuestos, pudieran evaluarse como aditivos de biofertilizantes por no ejercer una acción bactericida al aplicarse combinado con el inóculo en el momento de la siembra del cultivo.

A pesar de la actividad antimicrobiana que ejerce la quitosana sobre diversos fitopatógenos (14, 5), las concentraciones del polímero evaluado, no afectaron la viabilidad del simbionte, sino, ejercieron un efecto positivo en la nodulación de la soya cuando fue aplicado a semillas. Este efecto positivo en el crecimiento, el metabolismo y la simbiosis obtenido puede deberse a una acción sinérgica o aditiva de la quitosana con el inoculante de Azofert-S. Una acción aditiva se justifica por las potencialidades de estos polímeros para afectar positivamente diferentes procesos en las plantas. Es sabido que los derivados de quitosana favorecen el crecimiento, la floración y fructificación de diversos cultivos (15, 16), por lo que como resultado de efectos que favorecen los procesos mencionados, podría beneficiarse la simbiosis *Bradyrhizobium-soya*. Aparentemente, este efecto en el crecimiento y desarrollo podría ocurrir por una acción antitranspirante (17), elicitora (18), mejoradora de la actividad fotosintética (19) y/o por absorción de la quitosana a través de las raíces y su posterior uso por la planta (17).

La explicación del efecto benéfico en la simbiosis podría estar relacionada, también, con la similitud estructural entre los derivados de quitina y los factores de nodulación (*Nod*). La estructura de los factores *Nod* producidos por los diferentes rizobios, contiene básicamente un esqueleto compuesto por oligosacáridos de quitina. Estas moléculas son las responsables de iniciar el proceso de formación del nódulo en las raíces de las leguminosas (20). Esta estructura básica existe en todos los factores *Nod* conocidos, difiriendo en el número de unidades de N-acetil-glucosamina que la constituyen y los sustituyentes unidos a este esqueleto de quitina.

Por otra parte, se ha comprobado que la aplicación de factores de nodulación promueve la germinación y el crecimiento temprano de diversos cultivos (21), además de elevar las tasas fotosintéticas en diferentes cultivos e incrementar la acumulación de algunos compuestos del metabolismo secundario (18), probablemente por acción reguladora del crecimiento o elicitora del esqueleto de oligoquitinas.

Los efectos antes mencionados, también han sido encontrados en soya con diferentes formas de aplicación y compuestos de quitosanas en el contenido de isoflavonas (daidzeína, genisteína y gliceteína), los niveles transcripcionales de genes y enzimas claves en la vía de los fenilpropanoides (18, 22). Las isoflavonas constituyen importantes moléculas atrayentes de los rizobios e inductoras de los genes *Nod* en dichas bacterias (23).

Todo lo anterior justificaría el efecto positivo encontrado con el polímero que podrían incrementar la percepción de la señal simbiótica y desencadenar la nodulación por la planta en presencia del inóculo de Azofert-S. Adicionalmente, estos fragmentos pueden inducir la producción de concentraciones mayores de flavonoides en las raíces de la planta, que al excretarse al sustrato activarían los genes *Nod* en la bacteria, lo que se traduciría en la síntesis de una cantidad mayor de los morfógenos y finalmente en una nodulación mejor.

Los resultados antes mencionados en la discusión constituyen elementos a tomar en cuenta para conformar el modo de acción de las quitosanas, que no ha sido esclarecido, en el crecimiento y desarrollo de los cultivos, propiciando beneficios en los mismos y en la interacción simbiótica de las leguminosas con sus simbioses.

Bibliografías.

1. Graham, P.H. y Vance, C.P. 2003. Update on legume utilization. Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiology, vol. 131:872-877.
2. García, F.O. Soja: criterios para el manejo de la fertilización del cultivo. Revista Informaciones Agronómicas del Cono Sur, INPOFOS, N°27. 2005. 24 págs.
3. Nguyen, A. D. Enhancing Crop Production with Chitosan and Its Derivatives. In: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, 2010. CRC Press, pp 619-631. doi:doi:10.1201/EBK1439816035-c42.
4. El Hadrami, A.; Adam, L.R.; El Hadrami, I.; Daayf, F. 2010. Chitosan in Plant Protection. Marine Drugs, vol. 8, p. 968-987.

5. Falcón-Rodríguez, A. B.; Wégria, G. y Cabrera, J. C. Exploiting plant innate immunity to protect crops against biotic stress: Chitosaccharides as natural and suitable candidates for this purpose. En: "New Perspectives in Plant Protection". In Tech. Croatia. 2012. 139 p. ISBN 979-953-307-548-7.
6. Costales, D.M. 2010. Quitosacáridos en la nodulación y el crecimiento *in vitro* de soya (*Glycine max* [L.] Merrill) inoculada con *Bradyrhizobium elkanii*. [Tesis de maestría]. INCA. La Habana.
7. Mondal, M.M.A.; Ilias Khan Rana, M.D.; Dafader, N.C.; Haque, M.E. 2011. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in Indian Spinach. *J. Agrofor. Environ*, vol. 5 (1): 99-102, ISSN 1995-6983.
8. Limpanavech; Pichyungkura, R.; Khunwasi, C.; Chadchawan, S., Lotrakul, P.; Bunjoungrat, P.; Chaidu, A.; Akaraekpanya, T. 2003. The effects of polymer type, concentration and % DD of bicatalyte modified chitosan on flora production of *Dendrobium* "Eiskul". National chitin-chitosan Conference, July 17-18. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
9. Mahdavi, Batool. Seed germination and growth responses of Isabgol (*Plantago ovata* Forsk) to chitosan and salinity. *Intl J Agri Crop Sci.*, vol., 5 (10), 1084-1088, 2013.
10. Cho, M.H.; No, H.K.; Prinyawiwatkul, W. 2008. Chitosan Treatments Affect Growth and Selected Quality of Sunflower Sprouts. *Journal of Food Science*, Vol. 73, N. 1.
11. Abdel-Mawgoud, A.M.R.; Tantawy, A.S.; El-Nemr, M.A.; Sassine, Y.N., 2010. Growth and Yield Responses of Strawberry Plants to Chitosan Application. *European Journal of Scientific Research*, ISSN 1450-216X, vol.39 No.1 (2010), pp.161-168.
12. Uthairatanakij, A.; Teixeira da Silva, J.A.; Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Sci Biotech* 1:1-5.
13. Sheikha, A.K.S.A.; Al-Malki, F.M., 2011. Growth and Chlorophyll Responses of Bean Plants to the Chitosan Applications. *European Journal of Scientific Research*, ISSN 1450-216X, 2011, vol.50 (1), pp.124-134.
14. Huang, L.; Cheng, X.; Liu, C.H.; Xing, K.; Zhang, J.; Sun, G.; Li, X.; Chen, X. (2009). Preparation, characterization, and antibacterial activity of oleic acidgrafted chitosan oligosaccharide nanoparticles. *Frontiers of Biology in China*, vol. 4 (3): 321-327.
15. Utsunomiya, N.; Kinai, H.; Matsui, Y.; Takebayashi, T. 1998. The effects of chitosan oligosaccharides soil conditioner and nitrogen fertilizer on the flowering and fruit growth of purple passion fruit (*Pasiflora edulis* Sims var. *edulis*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* vol. 67, p. 567-571.
16. Ohta, K.; Morishita, S.; Suda, K.; Kobayashi, N. y Hosoki, T. 2004. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* vol. 73, no. 1, p. 66-68.
17. Bitelli, M; Flury, M; Campbell, G.S; Nichols, E.J. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2001, vol. 107, p. 167-175.
18. Mal-Tawaha, A.; Seguin, P.; Smith, D.L.; Beaulieu, C. 2005. Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seed. *Annals of Applied Biology*, 146: 303-310.
19. Khan, W.M., Prithiviraj, B. and Smith, D.L. 2003. Chitosan and chitin oligomer increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia lyase activities in soybean leaves. *J. Plant Physiol.*, 160 : 859-863.
20. Mulder, L.; Hogg, B.; Bersoult, A.; Cullimore, J.V. 2005. Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiology Plantarum*, vol. 123 (2): 207.
21. Prithiviraj, B.; Zhou, X.; Souleimanov, A.; Khan, W.M.; Smith, D.L. 2003. A host specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta*, vol. 216(5):890.
22. Chen, W.G.; Liu, X.; Chen, H.X. 2009. Preparation of modified chitosan with quaternary ammonium salt. *Textile Bioeng. Infor. Symp. Proc.*, 1, 226- 230 pages.
23. Subramanian, S.; Stacey, G.; Yu, O. 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*, vol. 48: 261-273.